

AU

T R A N S L A T I O N

Japan Patent Agency, Gazette for Unexamined Patents (JP,A)

Patent Application disclosure: Kokai H9-327290 (1997)

Disclosure Date: December 22, 1997

Inventions: 1 (Total of 6 pages)

Request for Examination: Requested 10

Int. Cl.6 Identification Symbol Intra-agency No.

C12N 15/09 9282-4B

C07H 1/08

21/04

C12Q 1/68 7823-4B

METHOD FOR EXTRACTING AND REFINING PLASMID DNA

Application No.: H8-149127 (1996)

Application Date: June 11, 1996

Inventors: ISHIDA, Yoshikazu; IKEDA, Katsutoku; UEMURA, Hideki;

KAWAKAMI, Fumikio and KAWAMURA, Yoshihisa

Applicant: Tokyo Boseki KK  
Osaka-fu, Osaka-shi, Kita-ku, Doshimahama 2-2-8

[Title of Invention]

METHOD FOR EXTRACTING AND REFINING PLASMID DNA

[Summary]

[Objective]

This invention offers a method for refining by extracting a highly pure plasmid DNA within a short period of time from either a microorganism or cell containing plasmid DNA without having a complicated operation.

[Means of Resolution]

A method for extracting and refining plasmid DNA that consists of the following processes (a) through (c) and uses a plasmid DNA extraction refinement reagent kit.

(a) A pH 3 - 6 cell dissolving solution containing a chaotropic substance, an extraction solution consisting of an organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with either a microorganism or cell which holds plasmid DNA. The plasmid DNA is absorbed by a solid-phase carrier.

(b) The solid-phase carrier which had a plasmid DNA absorbed during the process (a) is washed by a washing solution.

(c) A plasmid DNA is then eluted from the solid-phase carrier washed during the process (b) using eluent.

[Claims]

[Claim 1]

A method for extracting and refining plasmid DNA that consists of the following processes (a) through (c).

(a) A pH 3 - 6 cell dissolving solution containing (kaotropic) substance, an extraction solution consisting of an organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with either a microorganism or a cell which holds plasmid DNA. The plasmid DNA is absorbed by a solid-phase carrier.

(b) The solid-phase carrier over which has been absorbed a plasmid DNA during the process (a) is washed by a washing solution.

(c) A plasmid DNA is then eluted from the solid-phase carrier washed during the process (b) by using eluent.

[Claim 2]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein either the microorganism or cell which holds plasmid DNA is a bacterium.

[Claim 3]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein the pH 3 - 6 cell dissolving solution consisting of chaotropic substance which contains guanidine thio-cyanate and sodium acetate-hydrochloric acid (pH 4.0).

[Claim 4]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein the organic solvent is a water-saturated or buffer solution saturated phenol, chloroform or a combination of these.

[Claim 5]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned

in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid- phase carrier is a carrier containing silica.

[Claim 6]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid- phase carrier is a particle.

[Claim 7]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid- phase carrier is a particle containing a superparamagnetic metal oxide.

[Claim 8]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein the extracting solution is either water or TE buffer.

[Claim 9]

The method for extracting and refining a plasmid DNA mentioned in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid- phase carrier is a simplex containing a superparamagnetic metal oxide. The method also consists of a process for separating the nucleic acid bondable solid-phase carrier and liquid-phase by using magnetic power.

[Claim 10]

A plasmid DNA extraction and refinement reagent kit which consists of pH 3 - 6 dissolving solution containing chaotropic substance, an extracting solution consisting of an organic solvent, a solid-phase carrier for nucleic acid bonding, a washing solution

and an eluent.

[Detailed Explanation of Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application]

This invention concerns a method for simply extracting a highly pure plasmid DNA from either a microorganism or a cell which holds plasmid DNA by using a nucleic acid bondable solid- phase carrier and a plasmid DNA extraction and refinement reagent kit for use in this method. This reagent kit is also applicable to an automatic nucleic acid extracting device.

[0002]

[Prior Art Technology]

The extraction refinement of nucleic acid from an organism material, e.g., a cell containing nucleic acid, is an important step in the fields of gene technology and clinical diagnosis. For example, in a case of analyzing a certain gene, it is necessary to extract nucleic acid (e.g., DNA and RNA) from the organism material (e.g., cell which holds the gene). In the case of DNA/RNA diagnosis for the detection of a contagious body (e.g., bacterium and virus), detection is also necessary after the nucleic acid of bacterium or virus is extracted from the organism material (e.g., blood, etc.) DNA or RNA nucleic acid which is commonly contained in an organism material does not exist under liberated conditions, but exists in the shell, e.g., the membrane and wall of the cell which is comprised of protein, lipid and sugar. In most cases, a nucleic acid itself is formed of a complex of protein. Therefore,

when extracting and refining a nucleic acid from an organism material, a nucleic acid is liberated by conducting a physical crushing treatment by either supersonic wave or heat, an enzyme treatment by protease, and treatment using a surfactant and modifier, etc. Nucleic acid must be refined from the crushed substance by an extraction operation or by ultracentrifugal separation using an organic solvent (e.g., phenol, etc.) and column chromatography, etc. using a carrier (e.g., an ion exchanging body, etc.). These methods have been optimumly used for a nucleic acid and starting material and also by combining them according to the use of the extracted nucleic acid.

[0003]

In the past, alkali lytic and boiling means, etc. [Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)] have been conducted as the means of extraction of plasmid DNA from bacteria which hold plasmid DNA, especially, colibacillus. However, these means require a very troublesome and complicated process, such as centrifugal separation, etc. The inside of the DNA sample extracted by these means also contains a considerable amount of RNA and protein, etc. which has a harmful influence on subsequent analysis. Consequently, in order to obtain a highly pure plasmid DNA, after the extraction operation has been conducted, there must be an ultrafrugal separation operation (which uses a density gradient by cellenium chloride) or a required complicated and lengthy RNA and protein removal operation (typically conducted for a ribonuclease

digestion and phenol/chloroform extraction).

[0004]

On the other hand, a method for using a hydroxy appetite as a nucleic acid bondable solid-phase [Beland, F.A., etc., J. Chromatography, 174, 177-186 (1979)] has been known as a method for simply extracting plasmid DNA which does not especially require the genom DNA and protein removal operation to be conducted. According to this method, only a plasmid DNA can be extracted from a bacteriolytic solution; RNA and protein are also nearly absorbed by hydroxy appetite. Therefore, a mixing in of these can be almost completely prevented. However, in this method, there is a comparatively high density-buffer solution, (e.g., 0.3M phosphoric acid buffer solution, etc.) Consequently, when using the extracted plasmid DNA for analysis of, for example, enzyme restriction digestion or sequence, etc., the buffer solution has to be removed by dialysis or filtration. Therefore, requires a lengthy operation and is a problem.

[0005]

There is also a method for using a silica as a nucleic acid bondable solid-phase carrier [Japanese Kokai Patent No. H2-289596] as a simple means of nucleic acid extraction. This method has the following merits. A nucleic acid is extractable from an organism material, (e.g., bacteria, etc.) by one stage; a specific operation of desalination concentration is unnecessary; and the extracted nucleic acid is immediately used for subsequent analysis. However, when conducting the extraction of plasmid DNA from bacteria which

holds plasmid DNA, a genom DNA is also absorbed by silica, the same as plasmid DNA. Therefore, a refining operation (e.g., ultracentrifugal separation or column chromatography, etc.) is unquestionably required in order to extract only a highly pure plasmid DNA.

[0006]

[Problems Resolving by Invention]

The objective of this invention is to resolve these prior art technological problems. This invention offers a method for extracting and refining a highly pure plasmid DNA within a short period of time either from a microorganism or cell which hold plasmid DNA without requiring a complicated operation.

[0007]

[Means for Resolving Problems]

The inventors have discovered this invention by conducting a simple extraction and refinement of plasmid DNA either from microorganisms or cells by using a proper cell dissolving solution, organic solvent and nucleic acid bondable solid-phase carrier.

[0008]

More specifically, this invention is a method for extracting and refining plasmid DNA that consists of the following processes (a) through (c) and uses a plasmid DNA extraction refinement reagent kit.

(a) A pH 3 - 6 cell dissolving solution containing a (kaotropic) substance, an extraction solution consisting of an organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier are



added, mixed or make contact with either a microorganism or cell which holds plasmid DNA. The plasmid DNA is absorbed by a solid-phase carrier.

(b) The solid-phase carrier which had a plasmid DNA absorbed during the process (a) is washed by a washing solution.

(c) A plasmid DNA is then eluted from the solid-phase carrier washed during the process (b) using eluent.

[0009]

This invention is also a plasmid DNA extraction and refinement reagent kit which consists of pH 3 - 6 dissolving solution containing chaotropic substance, an extracting solution consisting of an organic solvent, a solid-phase carrier for nucleic acid bonding, a washing solution and an eluent.

[0010]

[Enforcement Mode of Invention]

This invention's method for extracting and refining plasmid DNA is conducted by largely dividing it into the following three stages: (a) a dissolving/absorbing process; (b) a washing process; and (c) an eluting process.

[0011]

In (a) the dissolving/absorbing process, a cell dissolving solution, organic solvent and nucleic bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with the microorganism or cell which holds plasmid DNA; the microorganism or cell is dissolved and the plasmid DNA is absorbed to the nucleic acid bondable solid-phase.

[0012]

The typical microorganism or cell which holds plasmid DNA used in this invention is the transformation body of colibacillus. The starting material is the transformation body of this colibacillus, commonly one which has been cultivated all night by using a suitably selected culture ground by a well-known method and collected. The plasmid DNA which is the extraction object here is one which is used as a vector. Therefore, a cosmid DNA is certainly included in the plasmid DNA mentioned here.

[0013]

The pH of the cell dissolving solution used in this invention is set as pH 3 - 6 by having a buffer solution. This buffer solution can be contained before hand in the cell dissolving solution and also can be added as the buffer solution after the cell has dissolved. There is no particular restriction as to this buffer; a commonly used buffer solution can be used. However, one which has a buffer ability in the area of pH 3 - 6 is preferred. For example, sodium acetate-acetic acid, sodium acetate, hydrochloric acid, etc. are used. The preferred use density is 1 - 500nm, and the pH is preferred to be in the range of 3 - 6.

[0014]

A chaotropic substance is contained in the cell dissolving solution used in this invention. There is no particular restriction as to the chaotropic substance. One which has an increasing action of water solubility of hydrophobic molecules and is able to contribute to the bonding to the solid phase of the

plasmid DNA (e.g., a commonly known chaotropic substance) can be used as the chaotropic substance. More specifically, a guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloric acid, sodium iodide, potassium iodide, sodium perchloric acid, etc. are used. A guanidine thiocyanate is especially preferable. The density of these (kaotropic) substances used differs depending on the type of (kaotropic) substance. However, when a guanidine thiocyanate is used, it is preferably used in the range of 3 - 5.5M.

[0015]

A surfactant can be contained in the cell dissolving solution in order to crush the cell membrane or to modify a protein which is contained in the cell. There is no particular restriction as to the surfactant as long as the one used is for the extraction of nucleic acid from the cell, etc. More specifically, a nonionic surfactant, (e.g., polyoxy ethylene octyl phenyl ether, polyoxy ethylene solbitane monolaurate, polyoxy ethylene solbitane monolaurate, etc.); a cationic surfactant, (e.g., dodecyl trimethyl ammonium bromide, dodecyl trimethyl ammonium chloride, cetyl trimethyl ammonium bromide, etc.); a nonionic surfactant, (e.g., dodecyl sodium sulfate, N-lauryl sodium sarcosine, sodium chloric acid, etc.); and an amphoteric surfactant, (e.g., phosphor thidil ethanol amine, etc.). Especially preferable is a nonionic surfactant, (e.g., polyoxy ethylene octyl phenyl ether, polyoxy ethylene solbitane monolaurate, etc.). The density of the surfactants differs depending on the surfactant used, but when polyoxy ethylene octyl phenyl ether is used, the preferable range

is 0.1 - 3%.

[0016]

There is no particular restriction as to the organic solvent used in this invention as long as it is one which does not obstruct the bonding of the solid-phase of plasmid DNA but which does obstruct the bonding of the solid-phase of genome DNA. This specification is not clear. However, it is felt that the organic solvent optimumly decreases the polarity of the liquid phase by adding it to a liquid phase. Therefore, it contributes to the selectivity of the bonding of the solid-phase of plasmid DNA and genome DNA which have different molecular surface polarity. A concrete example of the organic solvent used in this invention is a water-saturation phenol, buffer solution saturation phenol, chroloform, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-propanol, acetone, etc. Especially preferable is a water-saturation phenol or buffer solution saturation phenol or the mixture of saturation phenol and chloroform in proper proportion.

[0017]

There is no particular restriction as to the nucleic acid bondable solid-phase carrier used in this invention as long as the solid-phase absorbs nucleic acid under the presence of chaotropic ion. More specifically, one which has a hydrophilic surface able to hold by reversible bonding, e.g., a dioxide silicate. Even more specifically, silica is preferably used. The other substance is also composed of silica, (e.g., glass, diatomaceous earth, one which has its surface treated by chemical modification or a complex

of other substances such as superparamagnetic metal oxide, etc.).

It may be used as long as it is one which does not obstruct the reversible bonding of the nucleic acid. There is also no particular restriction as to the form of the nucleic acid bondable solid-phase carrier, (e.g., grain, filter and reaction container, etc.) However, when considering the effectiveness of absorption and elution, the grain form is preferable. A grain diameter of 0.05 - 500um is preferably used.

[0018]

These cell dissolving solution, organic solvent and nucleic acid bondable solid-phase is either added separately or simultaneously.

[0019]

The washing process (b) is a process to separate as much as possible of only the nucleic acid bondable solid-phase carrier, which has absorbed plasmid DNA from the mixture of the cell crushing substance, the cell dissolving solution, the organic solvent and nucleic bondable solid-phase carrier. At this point, washing is preferably repeated one to three times using the washing solution.

[0020]

A concrete means for separating the nucleic acid solid-phase carrier in this invention differs depending on the form of the solid-phase used. For example, when using the grain form of nucleic acid bondable solid-phase, a centrifugal separation, filtration, and a column operation, etc. are preferred. When using

one which contains superparamagnetic metal oxide in the grain as the solid-phase carrier, a simple means of magnetic separation which uses a magnet, etc. is possible and more preferable.

[0021]

There is no particular restriction as to the washing solution used in this invention, so long as it is one which does not accelerate the elution of plasmid DNA from solid-phase but which does obstruct the bonding of the solid-phase of genome DNA and protein.

More specifically, a 3 - 5.5M guanidine thiocyanate solution and 40 - 100% ethanol are preferred. Best results can be achieved by using these washing solutions. More specifically, after it is washed with a guanidine thiocyanate solution, it is preferably washed with 40% - 100% ethanol. When the cell dissolving solution and organic solvent used during the dissolving/absorbing processes are used as the washing solution, the removing of genome DNA and protein is more effectively conducted. At this point, it is preferably washed continuously with 40% - 100% ethanol.

[0022]

The eluting process (c) is a process for eluting the DNA from the nucleic acid bondable solid-phase carrier which has absorbed plasmid DNA. Therefore, there is no particular restriction as to the eluent used in this invention, as long as it is one which accelerates the elution of the plasmid DNA from solid-phase. More specifically, a water or TE buffer [10mM tris hydrochloric acid buffer solution, 1mM EDTA, pH8.0] is preferred. The recovered

plasmid DNA at this point can be directly used for enzyme reaction which has used a restriction enzyme or DNA polymerase, etc. without conducting a desalination (e.g., a dialysis and ethanol precipitation, etc.) and a concentration operation.

[0023]

As explained above, this invention's method for extracting and refining plasmid DNA is easily applicable to a plasmid DNA extraction refinement kit and a nucleic acid extractor which has automated the separation operation and the reagent dividing injection operation. This is because the processes of this invention are simple.

[0024]

[Examples]

This invention is explained more specifically with reference to the accompanying following examples. However, it is not restricted only to these following examples.

Example 1:

THE EXTRACTION  
OF PLASMID DNA FROM COLIBACILLUS pBR322/HB101

(1) The preparation of colibacillus pBR322/HB101

A colibacillus HB101 transformation body (pBR322/HB101) which has been transformed by plasmid pBR322 (Toyo Boseki KK) is cultivated in 100ml of LB culture ground [10g/l tryptone, 5g/l yeast extract, 5g/l sodium chloride (pH7.5)] and cultivated for 15 hours at a cultivation temperature of 37°C and a vibration speed of 180 rpm. After the cultivation is finished, the cultivation solution is separately injected 1.5ml at a time into a 1.5 ml

content microtube. It is then centrifugally separated for one minute at 12,000 rpm by a high-speed oligodynamic cooling centrifugal separator (MR-150: Tommy Seiko KK); a supernatant is removed. The obtained biomass is used as the extraction material.

[0025]

## (2) Extraction and Refinement of Plasmid DNA

500ul of cell dissolving solution [4.7M guanidine thiocyanate, 92mM sodium acetate-hydrochloric acid (pH 4.0), 1.2% polyoxy ethylene octyl phnyl ether, 20mM EDTA] are added to the above (1) prepared biomass and bacterized. 500ul of TB buffer saturation phenol/chroloform (1:1) are continuously added and vigorously mixed. 40ul of 0.5g/ml magnetic silica (grain diameter 1 - 10um, containing 30% of triiron tetraoxide, specific surface 280m<sup>2</sup>/g, pore capacity 0.025ml/g, surface hole diameter 2 - 6nm: Suzuki Yushi KK) suspension solution are added to the result and mixed for 10 minutes at room temperature. Magnetic silica grains are gathered by setting the microtube on a magnetic stand (MPC-M: Dainal KK); supernatent is removed. After the microtube is removed from the magnetic stand, 1 ml of washing solution [5.3M guanidine thiocyanate, 52mM tris-hydrochloric acid (pH 6.4)] is added and sufficiently mixed and placed on the same magnetic stand and the supernatent is removed. The grain is then washed. In the same manner as above, the grain is washed again with 1 ml of washing solution and continuously washed twice with 1 ml of 70% ethanol and washed once with 100% ethanol. After the supernatent is removed, a microtube is set on a 55°C heat block and left for 20 minutes.



The ethanol inside of the tube is evaporated and removed. The grains are the dried. 100 ul of a sterile solution are added to this and mixed for 10 minutes at room temperature. The result is then placed on a magnetic stand and magnetic silica grains are collected, and a supernatant is recovered. The amount of recovered solution was almost 80 ul.

[0026]

10 ul of the recovered solution are placed in a (agarose gel) cataphoresis. After the result is colored with ethidium bromide, it is photographed. The results are shown in Figure 1 (line 3). As is clear from Figure 1 (line 3), the celibacillus genome original DNA and RNA mixed in are almost unseen, but the extraction and refinement of highly pure plasmid DNA can be seen. In Figure 1, line 1 indicates a size marker consisting of PstI digestive substance of randafarge (phonetic translation) DNA. Line 2 indicates a migration pattern of commercially available pBR322DNA. Line 3 indicates a migration pattern of pBR322DNA which is extracted and refined by Example 1's method. Line 4 indicates a migration pattern of the EcoRI digestive substance of commercially available pBR 322DNA. Line 5 indicated a migration pattern of the EcoRI digestive substance of pBR322DNA which is extracted and refined by the Example 1's method.

[0027]

### (3) Restriction Enzyme Digestion of Plasmid DNA

1 ul of 10 x H buffer [500mM tris-hydrochloric acid (pH 7.5), 1M sodium chloride, 100mM magnesium chloride, 10m dithio-threitol]

and 1U/ul of 1 ul EcoRI (Toyo Boseki KK) are added and mixed in 8ul of the recovered solution obtained in (2) and left for 3 hours at 37 °C.

[0028]

The reaction solution is placed on a (agarose gel) electrophoresis, colored with (ethidium bromide) and photographed. The result is then indicated in Figure 1 (line 5). The plasmid DNA which is extracted and refined by this invention's method can be recognized in that it has been completely cut by a restriction enzyme EcoRI and is immediately usable for restriction enzyme digestion.

[0029]

Example 2:

EXTRACTION OF PLASMID DNA  
FROM COLIBACILLUS pUC19/JM109

(1) Preparation of Colibacillus pUC19/JM109

The transformation body (pUC19/JM109) of colibacillus JM109 which has transformed by plasmid pUC19 (Toyo Boseki kk) is cultivated in 100ml SB culture ground [32g/l tryptone, 20g/l yeast extract, 5g/l sodium chloride, 5ml 1N NaOH] (pH7.5)] and cultivated for 15 hours at a cultivation temperature of 37 °C and a vibration speed of 180 rpm. After the cultivation is finished, the cultivation solution is separately injected 1.5ml at a time into a 1.5 ml content microtube. It is then centrifugally separated for one minute at 12,000 rpm by a high-speed oligodynamic cooling centrifugal separator (MR-150: Tommy Seiko KK); a supernatant is removed. The obtained biomass is used as the extraction material.

[0030]

(2) Extraction Refinement of Plasmid DNA

By using the same method as in Example 1, a plasmid pUC19 DNA is extracted and refined from the biomass prepared in (1). 600 ul of cell dissolving solution [5M guanidine thiocyanate, 100mM sodium acetate-hydrochloric acid (pH4.0)] are added to the biomass and bacterized. 300 ul TE buffer saturation phenol are continuously added and vigorously mixed. 40ul of 0.5g/ml magnetic silica (grain diameter 1 - 10um, containing 30% of triiron tetraoxide, specific surface  $280\text{m}^2/\text{g}$ , pore capacity  $0.025\text{ml/g}$ , surface hole diameter 2 - 6nm: Suzuki Yushi KK) suspension solution are added to the result and mixed for 10 minutes at room temperature. Magnetic silica grains are gathered by setting the microtube on a magnetic stand (MPC-M: Dainal KK); supernatent is removed. After the microtube is removed from the magnetic stand, 750 ul cell dissolving solution [5M guanidine thiocyanate, 100mM sodium acetate-hydrochloric acid (pH4.0)] and 150 ul TE buffer saturation phenol as the washing solution are added, sufficiently mixed and placed on the same magnetic stand. The supernatent is removed. The grain is then washed. In the same manner as above, the grain is washed again and continuously washed twice with 1 ml of 70% ethanol. After the supernatent is removed, 100 ul of sterile solution are added to this and mixed for 10 minutes at room temperature. The result is then placed on a magnetic stand and magnetic silica grains are collected, and a supernatent is recovered. The amount of recovered solution was almost 100 ul.

[0031]

3 ul of the recovered solution are placed in (agarose gel) electrophoresis, colored with (ethidium bromide) and photographed. The result is shown in Figure 2 (line 3). As is clear from Figure 2 (line 3), the celibacillus genome original DNA and RNA that are mixed in are almost unseen, but the extraction and refinement of a highly pure plasmid DNA can be seen.

[0032]

### (3) Restriction Enzyme Digestion of Plasmid DNA

In the same manner as in Example 1, 1 ul of 10 x H buffer [100mM tris-hydrochloric acid (pH 7.5), 100mM magnesium chloride, 10mM dithiothreitol] and 1U/ul of 1ul KpnI (Toyo Boseki KK) are added and mixed in 8ul of the recovered solution obtained in (2) and left for 3 hours at 37°C. The reaction solution is placed in agarose gel electrophoresis, colored with ethidium bromide and photographed. The result is then indicated in Figure 2 (line 5). The plasmid DNA which is extracted and refined by this invention's method can be seen in that it has been completely cut by a restriction enzyme EcoRI and is immediately usable for restriction enzyme digestion. Figure 2, line 1 indicates a molecular weight marker consisting of PstI digestive substance of randafarge (phonetic translation) DNA. Line 2 indicates a migration pattern of commercially available pUC19DNA. Line 3 indicates a migration pattern of KpnI digestive substance of commercially available pUC19DNA which is extracted and refined by Example 2's method. Line 4 indicates a migration pattern of the KpnI digestive

substance of commercially available pUC19DNA. Line 5 indicates a migration pattern of the KpnI digestive substance of commercially available pUC19DNA which is extracted and refined by Example 2's method.

[0033]

[Effect of Invention]

With this invention, a highly pure plasmid DNA is uniquely absorbed from a microorganism or cell which holds plasmid DNA by using a dissolving solution having a pH 3 - 6 and containing chaotropic substance and nucleic acid bondable solid-phase carrier. Moreover, a plasmid DNA can be extracted and refined simply and within a short period of time without requiring a complicated post-treatment operation by using a proper eluent.

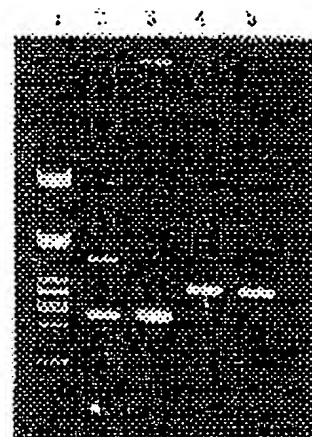
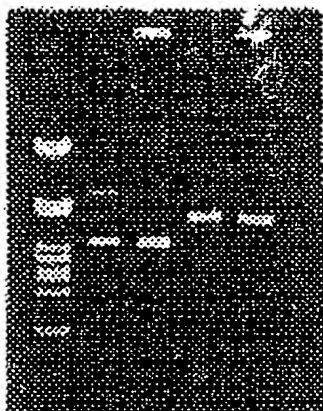
[Simple Explanation of Drawings]

[Figure 1]

Photograph in place of a drawing indicates the agarose gel electrophoresis pattern of plasmid pBR322DNA which has been extracted and refined by this invention's method and its restriction enzyme digestive substance.

[Figure 2]

Photograph in place of a drawing indicates the agarose gel electrophoresis pattern of plasmid pUC19DNA which has been extracted and refined by this invention's method and its restriction enzyme digestive substance.



Patent Applicant: Toyo Boseki KK

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-327290

(43) 公開日 平成9年(1997)12月22日

(51) Int. Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 H 1/08			C 0 7 H 1/08	
21/04			21/04	B
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平8-149127	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成8年(1996)6月11日	(72) 発明者	石田 由和 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	池田 勝徳 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	上村 秀喜 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミドDNAの抽出精製方法

(57) 【要約】

【課題】 プラスミドDNAを含む微生物または細胞からプラスミドDNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度でRNAを抽出し、精製する方法を提供する。

【解決手段】 下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするプラスミドDNAの抽出精製方法および該方法に使用するプラスミドDNA抽出精製試薬キット。

(a) プラスミドDNAを保持する微生物または細胞に、カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液、有機溶媒からなる抽出液および核酸結合性固相担体を添加、混合あるいは接触させることにより、該プラスミドDNAを固相担体上に吸着させ、(b) 上記(a)工程にてプラスミドDNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、かつ、(c) 上記(b)工程にて洗浄した固相担体から、溶出液によりプラスミドDNAを溶出させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするプラスミドDNAの抽出精製方法。

(a) プラスミドDNAを保持する微生物または細胞に、カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液、有機溶媒からなる抽出液および核酸結合性固相担体を添加、混合あるいは接触させることにより、該プラスミドDNAを固相担体上に吸着させ、

(b) 上記(a)工程にてプラスミドDNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、かつ、

(c) 上記(b)工程にて洗浄した固相担体から、溶出液によりプラスミドDNAを溶出させる。

【請求項2】 プラスミドDNAを保持する微生物または細胞がバクテリアである請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項3】 カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液が、グアニジンチオシアン酸塩および酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)を含む請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項4】 有機溶媒が水飽和または緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、またはこれらの組み合わせである請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項5】 核酸結合性固相担体がシリカを含む担体である請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項6】 核酸結合性固相担体が粒子である請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項7】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子である請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項8】 抽出液が水あるいはTEバッファーである請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項9】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む単体であって、さらに磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含む請求項1記載のプラスミドDNA抽出精製法。

【請求項10】 カオトロピックス物質を含むpH3～6の溶解液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含むプラスミドDNA抽出精製試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞から、核酸結合性固相担体を用いてプラスミドDNAを簡便かつ純度よく抽出する方法ならびに該方法に用いるためのプラスミドDNA抽出精製試薬キットに関する。該試薬キットは自動核酸抽出装置にも応用しうる。

## 【0002】

【従来の技術】 核酸を含有する細胞等の生物材料からの核酸の抽出精製は、遺伝子工学や臨床診断の分野では重

要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞等の生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA/RNA診断においても、血液等の生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、抽出することが必要である。一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAといった核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身もタンパク質との複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破砕処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を施すことにより核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破砕物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている。

【0003】 プラスミドDNAを保持するバクテリア、特に大腸菌からプラスミドDNAを抽出する方法としては、アルカリ溶菌法、ボイル法[Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]などが従来より行われてきた。しかし、これらの方法は遠心分離など煩雑な工程を含むため非常に手間がかかる作業である。さらに、これらの方法により抽出されたDNAサンプル中には、その後の解析にとって弊害となるRNAやタンパク質などが多く含まれている。そのため、純度よくプラスミドDNAを得るためには、これらの抽出操作を行った後に、塩化セシウムによる密度勾配を利用した超遠心分離操作や、リボヌクレアーゼ消化およびフェノール/クロロホルム抽出に代表されるような煩雑で、かつ長時間を要するRNAおよびタンパク質除去操作を行う必要がある。

【0004】 また、ゲノムDNAおよびタンパク質除去操作を特に行う必要がなく、簡便にプラスミドDNAを抽出しうる方法として、ヒドロキシアパタイトを核酸結合性固相として使用する方法[Beland, F. A. ら, J. Chromatography, 174, 177-186(1979)]が知られている。この方法によれば、溶菌液中のプラスミドDNAのみを抽出してることが可能であり、RNAやタンパク質はヒドロキシアパタイトにほとんど吸着しないため、これらの混入をほとんど防ぐことができる。しかし、この方法では、溶出液として制限酵素消化等の酵素反応を阻害する0.3Mリン酸緩衝液などの比較的高濃度の緩衝液を使用する。そのため、抽出したプラスミドDNAを制限酵素消化やシーケンシングなどの解析に使用する場合には、透析やゲルろ過等を施すことにより緩衝剤を除去することが必要となり、長時間を要するという問題があ

10

20

30

40

50



る。

【0005】一方、簡便な核酸抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法がある【特開平2-289596号公報】。この方法は、バクテリアなどの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能なうえ、溶出液として水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、特別な脱塩濃縮操作が不要で、抽出した核酸を直ちに後の解析に使用することができるという利点がある。しかし、この方法によりプラスミドDNAを保持するバクテリアからプラスミドDNAの抽出を試みた場合、ゲノムDNAもプラスミドDNAと同様にシリカへ吸着する。そのため、プラスミドDNAのみを純度よく抽出するためには、さらに超遠心分離やカラムクロマトグラフィー等の精製操作をおこなうことが必須である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来から存在する技術の上記問題点を解決することであり、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞からプラスミドDNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度で抽出し、精製する方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、適当な細胞溶解液、有機溶媒および核酸結合性固相担体により、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞からプラスミドDNAを簡便に抽出精製しうることを見出し、本発明に達した。

【0008】すなわち、本発明は下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするプラスミドDNAの抽出精製方法である。

(a) プラスミドDNAを保持する微生物または細胞に、カオトロピック物質を含むpH3～6の細胞溶解液、有機溶媒からなる抽出液および核酸結合性固相担体を添加し、混合あるいは接触させることにより、該プラスミドDNAを固相担体上に吸着させ、(b) 上記(a)工程にてプラスミドDNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、かつ、(c) 上記(b)工程にて洗浄した固相担体から、溶出液によりプラスミドDNAを溶出させる。

【0009】また、本発明はカオトロピック物質を含むpH3～6の溶解液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合用固相担体、洗浄液および溶出液を含むプラスミドDNA抽出精製試薬キットである。

【0010】

【発明の実施態様】本発明によるプラスミドDNAの抽出精製方法は、(a) 溶解・吸着工程、(b) 洗浄工程、(c) 溶出工程の3段階に大きく分けられる。

【0011】(a) 溶解・吸着工程では、プラスミドD

NAを保持する微生物または細胞に細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体を添加、混合あるいは接触させることにより、微生物または細胞を溶解し、プラスミドDNAを核酸結合性固相へ吸着させる。

【0012】本発明において用いられるプラスミドDNAを保持する微生物または細胞としては、例えば大腸菌の形質転換体が代表的なものである。この大腸菌の形質転換体の場合、通常は、公知の常法にしたがって適当な選択培地を使用して終夜培養され、遠心分離などの操作により集菌されたものが出発材料として使用される。また、ここで抽出対象となるプラスミドDNAは、周知のとおり、ベクターとして利用されるものである。したがって、ここでいうプラスミドDNAにはコスミドDNAも当然含まれる。

【0013】本発明において用いられる細胞溶解液には、緩衝剤を含有させ、pH3～6とする。これは、あらかじめ細胞溶解液に含まれていても、また細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。この緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば特に限定されないが、pH3～6の範囲のいずれかのpHにおいて緩衝能を有するものがより好ましい。例えば、酢酸ナトリウム・酢酸、酢酸ナトリウム・塩酸等が挙げられ、その使用濃度としては1～500nm、pHは3～6の範囲が好適である。

【0014】本発明において用いられる細胞溶解液には、カオトロピック物質が含まれる。カオトロピック物質としては、一般にカオロピックス物質として知られているような、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、さらにプラスミドDNAの固相への結合に寄与するものであれば特に限定されない。具体的には、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、よう化ナトリウム、よう化カリウム、過塩素酸ナトリウム等が挙げられる。これらのうち、グアニジンチオシアン酸塩が好ましく用いられる。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なり、例えば、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合に、3～5.5Mの範囲となるように使用するのが好ましい。

【0015】また、細胞溶解液には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で界面活性剤を含有させてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば特に限定されないが、具体的には、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の非イオン界面活性剤、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、コール酸ナ

トリウム等の陰イオン界面活性剤、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が挙げられる。これらのうち、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等の非イオン界面活性剤が好ましく用いられる。これらの界面活性剤の使用濃度は、用いられる界面活性剤により異なり、例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを使用する場合には、0.1～3%の範囲となるように使用するのが好ましい。

【0016】本発明において用いられる有機溶媒としては、プラスミドDNAの固相への結合を妨げるものでなく、かつゲノムDNAの固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。この原理についての詳細は不明であるが、有機溶媒を液相に添加することにより液相の極性を適度に下げ、そのことによって、分子表面の極性が異なるプラスミドDNAとゲノムDNAに固相との結合の選択性を付与しているものと考えられる。本発明において用いられる有機溶媒の具体例としては、水飽和フェノール、緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、3-メチル-1-プロパノール、アセトン等が挙げられる。これらのうち、水飽和フェノールまたは緩衝液飽和フェノール、あるいはこれら飽和フェノールとクロロホルムを適当な割合で混合したものが好ましい。

【0017】本発明において用いられる核酸結合性固相担体としては、カオトロピックイオンの存在下で核酸を吸着、すなわち可逆的な結合により保持することができる親水性表面を有する固体であれば特に限定されない。具体的には、二酸化ケイ素、すなわちシリカが好ましく用いられる。また、前記のような核酸との可逆的な結合を妨げるようなものでなければ、シリカから構成される他の物質、例えばガラス、ケイソウ土、あるいはこれらを化学的修飾により表面処理を施したものや、超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。また、この核酸結合性固相担体の形態としては、粒子、フィルター、反応容器等が具体的に挙げられるが特に限定されない。これらのうち、吸着と溶出の効率を考慮すると粒子の形態がより好ましく、このとき粒径は0.05～500μmがより好適である。

【0018】本発明においては、上記細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相を別々に添加しても、あるいは同時に添加しても良い。

【0019】(b) 洗浄工程は、細胞破砕物、細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体の混合物から、プラスミドDNAが吸着した核酸結合性固相担体のみを可能な限り分離する工程である。このとき、洗浄液を使用して1～3回程度、繰り返し洗浄するのが好ましい。

【0020】本発明における核酸結合性固相担体の分離のための具体的な手段としては、使用する固相担体の形態により異なる。例えば核酸結合性固相が粒子の形態で

ある場合には、遠心分離、ろ過、カラム操作等が好ましい。さらには、粒子内に超常磁性金属酸化物を含ませておいたものを固相担体として使用すれば、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能となり、より好適である。

【0021】本発明において用いられる洗浄液としては、固相からのプラスミドDNAの溶離を促進するものでなく、かつゲノムDNAやタンパク質の固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。具体的には、3～5.5Mグアニジンチオシアン酸溶液あるいは40%～100%エタノールが好ましく、これらの洗浄液を併用するとより好適である。つまり、まず、グアニジンチオシアン酸溶液で洗浄した後、さらに40%～100%エタノールで洗浄するのが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した細胞溶解液および有機溶媒を洗浄液として使用すると、ゲノムDNAとタンパク質の除去により有効である。このとき、続いて40%～100%エタノールで洗浄するのが好ましい。

【0022】(c) 溶出工程は、プラスミドDNAが吸着した核酸結合性固相担体から該DNAを溶離させる工程である。従って、本発明において用いられる溶出液としては、固相からのプラスミドDNAの溶離を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはTEバッファー[10mMトリス塩酸緩衝液、1mM EDTA、pH8.0]が好ましい。このとき回収したプラスミドDNAは、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、制限酵素やDNAポリメラーゼ等を使用した酵素反応に直接使用することができる。

【0023】上記のように、本発明によるプラスミドDNAの抽出精製方法は、単純な工程から構成されるため、プラスミドDNA抽出精製キットや、固相の分離操作や試薬分注操作を自動化した核酸抽出装置へ容易に応用しうることが明らかである。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

**実施例1** 大腸菌pBR322/HB101からのプラスミドDNAの抽出

(1) 大腸菌pBR322/HB101の調製

プラスミドpBR322(東洋紡績社製)で形質転換された大腸菌HB101形質転換体(pBR322/HB101)を100μg/mlのアンピシリンを含むLB培地[10g/l トリアトン、5g/l酵母エキス、5g/l塩化ナトリウム(pH7.5)]100mlに接種し、培養温度37℃、振とう速度180rpmで15時間培養した。培養後、培養液を1.5mlずつ1.5ml容マイクロチューブに分注し、高速微量冷却遠心分離機(MR-150:トミー精工社製)にて12,000rpm、1分間遠心分離し、上清を除去することにより得られた菌体を抽出材料とした。

【0025】(2) プラスミドDNAの抽出精製

上記(1)にて調製した菌体に500 $\mu$ lの細胞溶解液[4.7Mグアニジンチオシアン酸、92mM酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)、1.2%ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、20mM EDTA]を加えて溶菌させ、続いて500 $\mu$ lのTEバッファー飽和フェノール/クロロホルム(1:1)を加え、激しく混合した。これに、40 $\mu$ lの0.5g/ml磁性シリカ(粒径1~10 $\mu$ m、四三酸化鉄粒子30%含有、比表面積280m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2~6nm:鈴木油脂製)懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンド(MPC-M:ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドからはずし、1mlの洗浄液[5.3Mグアニジンチオシアン酸、52mMトリス塩酸(pH6.4)]を加えて十分に混合した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様に、1mlの洗浄液にて再度、粒子を洗浄し、続いて1mlの70%エタノールで2回、100%エタノールで1回粒子を洗浄した。上清を除去した後、マイクロチューブを55℃に設定したヒートブロック上に設置し、20分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発除去し、粒子を乾燥させた。これに100 $\mu$ lの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ80 $\mu$ lであった。

【0026】回収液のうちの10 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン3)に示す。図1(レーン3)から明らかなように、大腸菌ゲノム由来DNAやRNAの混入はほとんど見られず、高い純度でプラスミドDNAが抽出精製されたことが確認できる。図1中、レーン1は、ラムダファージDNAのPstI消化物からなるサイズマーカー、レーン2は市販のpBR322DNAの泳動パターン、レーン3は実施例1に示す方法により抽出精製されたpBR322DNAの泳動パターン、レーン4は市販のpBR322DNAのEcoRI消化物の泳動パターン、レーン5は実施例1に示す方法により抽出精製されたpBR322DNAのEcoRI消化物の泳動パターンを示す。

【0027】(3)プラスミドDNAの制限酵素消化  
上記(2)にて得られた回収液のうち8 $\mu$ lに1 $\mu$ lの10×Hバッファー[500mM トリス塩酸(pH7.5)、1M 塩化ナトリウム、100mM 塩化マグネシウム、10mMジチオスレイトール]、および1 $\mu$ lの1U/ $\mu$ lのEcoRI(東洋紡績社製)を添加混合し、37℃、3時間放置した。

【0028】反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン5)に示す。図1(レーン5)から明らかなように、本発明による方法にて抽出精製されたプラスミド

DNAは、制限酵素EcoRIによって完全に切断されており、直ちに、制限酵素消化に使用できることが確認できる。

【0029】実施例2 大腸菌pUC19/JM109からのプラスミドDNAの抽出

(1)大腸菌pUC19/JM109の調製

プラスミドpUC19(東洋紡績社製)で形質転換された大腸菌JM109の形質転換体(pUC19/JM109)を100 $\mu$ g/mlのアmpiシリンを含むSB培地[32g/l トリアトン、20g/l 酵母エキス、5g/l塩化ナトリウム、5ml 1N NaOH]100mlに接種し、培養温度37℃、振とう速度180rpmで15時間培養した。培養後、培養液を1.5mlずつ1.5ml容マイクロチューブに分注し、高速微量冷却遠心分離機(MR-150:トミー精工社製)にて12,000rpm、1分間遠心分離し、上清を除去することにより得られた菌体を抽出材料とした。

【0030】(2)プラスミドDNAの抽出精製

実施例1と同様な方法にして、上記(1)にて調製した菌体からプラスミドpUC19 DNAを抽出精製した。菌体に600 $\mu$ lの細胞溶解液[5Mグアニジンチオシアン酸、100mM 酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)]を加えて溶菌させ、続いて300 $\mu$ lのTEバッファー飽和フェノールを加え、激しく混合した。これに、40 $\mu$ lの0.5g/ml磁性シリカ(粒径1~10 $\mu$ m、四三酸化鉄粒子30%含有、比表面積280m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2~6nm:鈴木油脂製)懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンド(MPC-M:ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドからはずし、洗浄液として750 $\mu$ lの細胞溶解液[5Mグアニジンチオシアン酸、100mM 酢酸ナトリウム塩酸(pH4.0)]と150 $\mu$ lのTEバッファー飽和フェノールを加えて十分に混合した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様に、再度、粒子を洗浄し、続いて1mlの70%エタノールで2回粒子を洗浄した。上清を除去した後、これに100 $\mu$ lの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ100 $\mu$ lであった。

【0031】回収液のうちの3 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2(レーン3)に示す。図2(レーン3)から明らかなように、大腸菌ゲノム由来DNAやRNAの混入はほとんど見られず、高い純度でプラスミドDNAが抽出精製されたことが確認できる。

【0032】(3)プラスミドDNAの制限酵素消化  
実施例1と同様な方法にして、上記(2)にて得られた回収液のうち、8 $\mu$ lに1 $\mu$ lの10×Hバッファー[100mM トリス塩酸(pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、10mM

ジチオスレイトール]、および $1\mu\text{l}$ の $1\text{U}/\mu\text{l}$ のKpnI (東洋紡績社製)を添加混合し、 $37^\circ\text{C}$ 、3時間放置した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2 (レーン5) に示す。図2 (レーン5) から明らかなように、本発明による方法にて抽出精製されたプラスミドDNAは、制限酵素 KpnI によって完全に切断されており、直ちに制限酵素消化に使用できることが確認できる。図2中、レーン1は、ラムダファージDNAの PstI 消化物からなる分子量マーカー、レーン2は市販のpUC19 DNAの泳動パターン、レーン3は実施例2に示す方法により抽出精製されたpUC19 DNAの泳動パターン、レーン4は市販のpUC19 DNAの KpnI 消化物の泳動パターン、レーン5は実施例2に示す方法により抽出精製されたpUC19 DNAの KpnI 消化物の泳動パターンを示す。

【0033】

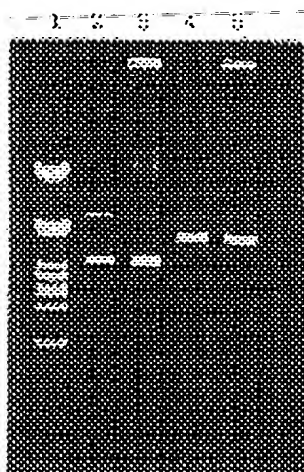
【発明の効果】本発明によれば、カオトロピック物質を含むpHが3～6である溶解液と核酸結合用固相担体を使用することにより、プラスミドDNAを保持する微生物または細胞から、高純度なプラスミドDNAを特異的に吸着させ、さらに適当な溶出液を使用することにより、煩雑な後処理操作を必要とすることなく短時間かつ簡便にプラスミドDNAを抽出精製することができる。

【図面の簡単な説明】

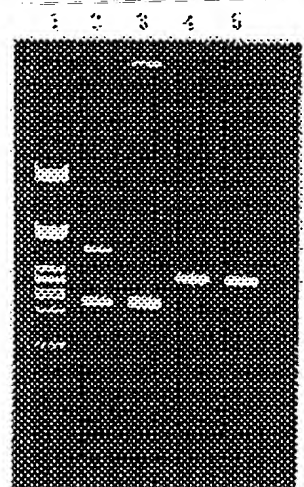
10 【図1】本発明の方法により抽出精製されたプラスミドpBR322 DNAとその制限酵素消化物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図2】本発明の方法により抽出精製されたプラスミドpUC19 DNAとその制限酵素消化物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内